

# EXTRACTION AND PURIFICATION OF DNA AND EQUIPMENT THEREFOR

**Publication number:** JP9047278 (A)

**Publication date:** 1997-02-18

**Inventor(s):** FUJISHIRO MASATOSHI; TOGASHI AKIO; TANI YOICHIRO; ISHII TAKAMARO +

**Applicant(s):** TOMY SEIKO KK +

**Classification:**

**- international:** C12N15/09; B01D61/18; B01L3/00; C07H21/04; C12M1/00; C12M1/12; C12N15/10; G01N35/02; G01N35/00; G01N35/04; G01N35/10; C12N15/09; B01D61/18; B01L3/00; C07H21/00; C12M1/00; C12M1/12; C12N15/10; G01N35/02; G01N35/00; G01N35/04; G01N35/10; (IPC1-7): C12N15/09; C12M1/00; C07H21/04; C12M1/12

**- European:** B01D61/18; B01L3/00C6D2; C12N15/10A3; G01N35/02P

**Application number:** JP19950199391 19950804

**Priority number(s):** JP19950199391 19950804

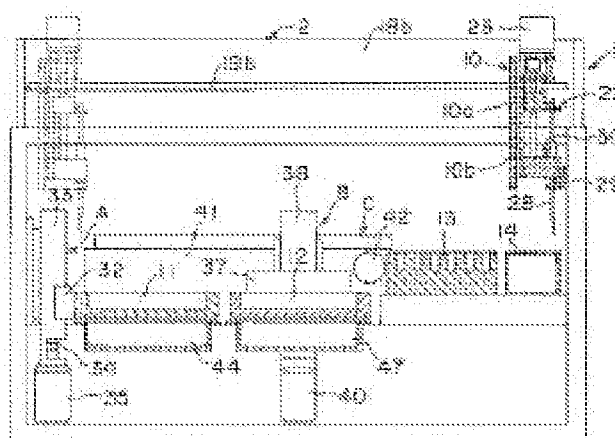
**Also published as:**

JP2832586 (B2)

US5645723 (A)

## Abstract of JP 9047278 (A)

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To enable the extraction and purification of DNA from a plurality of specimens. **SOLUTION:** The figure shows a DNA extraction and purification device. A pipetting unit 10 can be horizontally moved along a rail 19b with a transfer unit. In addition, this device is equipped with tube racks 11, 12 which can be transferred in horizontal and vertical directions. To the tube racks 11, 12, a filter tube for extracting and purifying DNA (not shown in the figure) is arranged and a waste solution tray 44 and a recovery tray 47 are arranged under these racks 11, 12. These waste liquid tray 44 and recovery tray 47 are respectively equipped with inlets to be connected to a vacuum pump (not shown).



(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平9-47278

(43) 公開日 平成9年(1997)2月18日

(51) Int.Cl. <sup>6</sup>	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
C 1 2 M 1/00			C 1 2 M 1/00	A
C 0 7 H 21/04			C 0 7 H 21/04	B
C 1 2 M 1/12			C 1 2 M 1/12	
// C 1 2 N 15/09	Z N A	9162-4B	C 1 2 N 15/00	Z N A A

審査請求 未請求 請求項の数9 O L (全 12 頁)

(21) 出願番号 特願平7-199391

(22) 出願日 平成7年(1995)8月4日

(71) 出願人 000134486

株式会社トミー精工

東京都練馬区旭町2丁目2番12号

(72) 発明者 藤城 正敏

東京都練馬区旭町2丁目2番12号 株式会社トミー精工内

(72) 発明者 富樫 明男

東京都練馬区旭町2丁目2番12号 株式会社トミー精工内

(72) 発明者 谷 洋一郎

東京都練馬区旭町2丁目2番12号 株式会社トミー精工内

(74) 代理人 弁理士 奥山 尚男 (外4名)

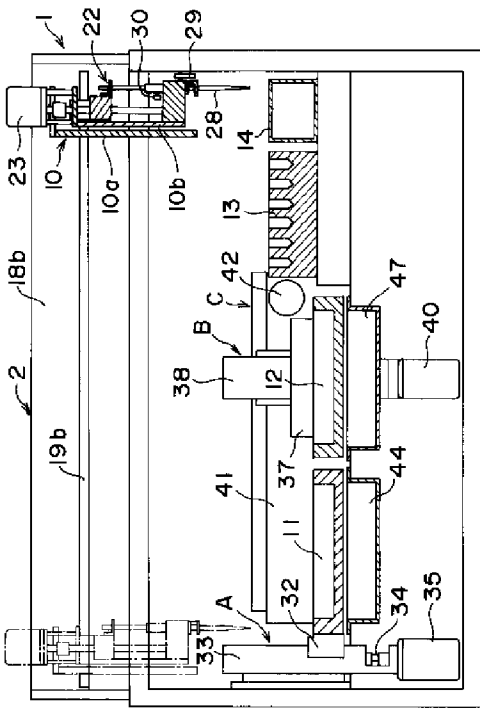
最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 DNA抽出精製方法及び装置

(57) 【要約】

【課題】 DNAの抽出精製を短時間でを行うこと。

【解決手段】 図はDNAの抽出精製装置1を示す。分注ユニット10は移送装置により、レール19bを水平方向に移送できる。また、この装置1には水平方向、垂直方向に移送可能なチューブラック11、12が配設される。チューブラック11、12には、図示されていないDNAを抽出精製するためのフィルターチューブが配設される。これらのチューブラック11、12の下方には、廃液バット44、回収バット47が配設される。廃液バット44、回収バット47には図示されていないが、真空ポンプに接続される吸入口が配設される。



## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 第 1 フィルターチューブを配設した第 1 チューブラック及び第 2 フィルターチューブを配設した第 2 チューブラックを移送装置で移送することにより、両チューブラックを上下に重ね合わせて減圧室を形成し、形質転換体培養液を第 1 フィルターチューブに集菌して、溶菌及び不要蛋白質や染色体 DNA の変性、必要に応じて RNA の分解を行い、真空装置により、第 1 フィルターチューブにより不純物を濾過して、第 2 フィルターチューブで DNA を吸着、洗浄、溶出する工程を順次に行う DNA 抽出精製方法。

【請求項 2】 DNA を抽出精製するための第 1 フィルターチューブを配設した第 1 チューブラックと、DNA を抽出精製するための第 2 フィルターチューブを配設した第 2 チューブラックと、上記第 1 のフィルターチューブと第 2 のフィルターチューブのフィルタを吸引するための真空装置とを備えた DNA 抽出精製装置。

【請求項 3】 上記第 1 フィルターチューブは、少なくともトラップフィルター及びメンブランフィルターを含み、上記第 2 フィルターチューブは、少なくともガラス繊維フィルター、ガラスパウダー層及びメンブランフィルターを含んで成る請求項 2 に記載の DNA 抽出精製装置。

【請求項 4】 上記第 1 チューブラックまたは第 2 チューブラックの底部と気密に当接可能な廃液バットを備え、上記第 1 チューブラックまたは第 2 チューブラックの底部と廃液バットとにより減圧室を形成したことから成る請求項 2 に記載の DNA 抽出精製装置。

【請求項 5】 第 2 チューブラックの底部と気密に当接可能な回収バットを備え、第 2 チューブラックの底部と回収バットとにより減圧室を形成したことから成る請求項 2 に記載の DNA 抽出精製装置。

【請求項 6】 少なくとも上記第 1 チューブラック及び第 2 チューブラックのいずれかに、底壁から内側壁を貫通する通路を設けるとともに、上記第 1 チューブラックと第 2 チューブラックを重ね合わせて減圧室を設けて成る請求項 2 に記載の DNA 抽出精製装置。

【請求項 7】 上記第 1 チューブラックを縦方向に移送する第 1 移送装置と、第 2 チューブラックを縦方向に移送する第 2 移送装置と、少なくとも上記第 1 チューブラックと第 2 チューブラックのいずれか 1 つを横方向に移送する第 3 移送装置と、上記第 1 ～ 第 3 の移送装置及び上記真空装置とを制御するための制御手段とを備えたことから成る請求項 2 に記載の DNA 抽出精製装置。

【請求項 8】 上記第 1 チューブラックおよび第 2 チューブラックに、上記第 1 フィルターチューブ及び第 2 フィルターチューブを規則通りに配置したかを判定するためのチューブ有無確認センサーを設けたことから成る請求項 2 に記載の DNA 抽出精製装置。

【請求項 9】 上記回収バット内に回収チューブを収納

する回収ラックを配設したかを判定するための回収ラック有無確認センサーを設けたことから成る請求項 5 に記載の DNA 抽出精製装置。

## 【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、多検体試料から DNA を短時間に抽出精製する DNA 抽出精製方法及び装置に関する。

【0002】

10 【従来の技術】従来、大腸菌等を形質転換した形質転換体からプラスミド DNA (核外遺伝子) を抽出精製する方法として、煮沸法 [BOILING METHOD (Hilmes, D. S. 及び M. Q. Igley, 1981, Anal. Biochem. 114: 193)] やアルカリ溶菌法 [ALKALINE LYSIS METHOD (Birnboim, H. C. 及び J. Doly, 1979, Nucleic Acids Res. 7: 1513)] 等が行われている。しかし、これらの方法は、フェノール、クロロホルム等の危険試薬を使用し、手間のかかる方法であった。

20 【0003】さらに、高純度の精製試料を得る方法として、塩化セシウム密度勾配遠心分離法によるプラスミド DNA の抽出精製方法がある。この方法は、高純度精製の代表的なものであるが、実施に長時間を要し、試料処理本数は、一度に 10 本程度である。また、従来の方法を自動化した機器も開発されているが、このような機器も一般的に高価であったり、処理サンプル数が少ない等の欠点を有しており、実用的には問題があった。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】形質転換法は、遺伝子操作の基本技術であり、ライフサイエンスあるいはバイオテクノロジーの研究開発にとって不可欠である。したがって、この方法によって得られた形質転換体 (特に、大腸菌等を形質転換したもの) から核外遺伝子 DNA を、高い安全性のもとに、全自動で短時間かつ高純度で抽出精製することが望まれていた。

【0005】本発明は上記課題に鑑みてなされたもので、形質転換体で複製増幅された核外遺伝子 DNA (プラスミド DNA) を、終夜培養液から全自動で安価に抽出精製することのできる DNA 抽出精製方法及び装置を提供することを目的とする。

40 【0006】

【課題を解決するための手段】以上の目的は、第 1 フィルターチューブを配設した第 1 チューブラック及び第 2 フィルターチューブを配設した第 2 チューブラックを移送装置で移送することにより、両チューブラックを上下に重ね合わせて減圧室を形成し、形質転換体培養液を第 1 フィルターチューブに集菌して、溶菌及び不要蛋白質や染色体 DNA の変性、必要に応じて RNA の分解を行い、真空装置により、第 1 フィルターチューブにより不純物を濾過して、第 2 フィルターチューブで DNA を吸着、洗浄、溶出する工程を順次に行う DNA 抽出精製方

法によって達成される。

【0007】また、以上の目的は、DNAを抽出精製するための第1フィルターチューブを配設した第1チューブラックと、DNAを抽出精製するための第2フィルターチューブを配設した第2チューブラックと、上記第1のフィルターチューブと第2のフィルターチューブのフィルタを吸引するための真空装置とを備えたDNA抽出精製装置によって達成される。

【0008】

【発明の実施の形態】以下、本発明のDNAの抽出精製方法及び装置の実施形態について、図面を参照しながら説明する。

【0009】図1は、本発明に係るDNA抽出精製装置1の全体図である。この抽出精製装置1は本体2とワゴン3とから成る。本体2は、前面に操作パネル4、ドア5、真空圧計6及びワゴン3との配管類等を接続する接続口7を配設している。また、本体2の側部には電源スイッチ8を、背後には電源コード9を配設している。なお、図示されていないが、ドア5にはドア開閉の検出スイッチを配設している。

【0010】図2及び図3は本体2の内部構造を示す。本体2は、分注ユニット10、第1チューブラック11、第2チューブラック12、リザーバー13及びピペットチューブスタンド14から成る。分注ユニット10は、本体2の内部を横方向に移動することができる。この機構を説明すると図4の平面図に示すように、分注ユニット10はメインブラケット10aにボールナット15aを取付け、これをボールねじ15bに螺合させている。モーター16を駆動すると、ベルト17の回転によりボールねじ15bが回転し、分注ユニット10は案内板18a、18bに取付けているレール19a、19bに沿って横方向に移動する。

【0011】分注ユニット10には、メインブラケット10aに高さ調整用モーター20を取付けている。高さ調整用モーター20の軸には、図5に示すようにボールねじ21aを取付け、このボールねじ21aにはサブブラケット10bに一体的に取付けているボールナット21bが螺合している。高さ調整用モーター20を駆動すると、図3に示すサブブラケット10bに取付けている分注部22が下方に下がる。

【0012】図5に示すように分注ユニット10は、分注用モーター23軸にボールねじ24aを取付け、このボールねじ24aにはピストン取付ステー25aに一体的に取付けているボールナット24bが螺合している。分注用モーター23が駆動すると、ステー25aが上下運動をし、6連のシリンダ26のピストン軸26aもそれに合わせて上下動をする。シリンダ26は、DNAを抽出精製する試薬を吸引、排出する。また、ステー25aが更に下がると、ステー25aの下面がロッド27aの上端部に当たる。このロッド27aはピペットチップ

28の外し板27cに取付けられ、外し板27cがピペットチップ28を下方に押下げ、ピペットチップ28は外れる。

【0013】シリンダ26を支持するシリンダブロック26cの側部には、チューブの有無を判断する6連のチューブ有無確認センサー29を取付けている。チューブ有無確認センサー29は反射型の光電素子を使用している。また、図3に示すようにシリンダ26の1つには液面センサー30を取付けている。この液面センサー30は吐出動作中における気圧の急変を検出して、液面の高さを判断する(特開平5-232124参照)。

【0014】図3に示すように、第1移送装置Aは、第1チューブラック11を垂直方向に移送するもので、把持部32にチューブラック11が着脱自在に取付けられる。把持部32は、案内板33に摺動自在に嵌合し、案内板33に平行に延設しているボールねじ34に螺合している。案内板33の下部に取付けている駆動モーター35を駆動すると、把持部32はチューブラック11と一体的に案内板33に沿って上下動する。

【0015】第2移送装置Bは、第2チューブラック12を垂直方向に移送するもので、把持部37にチューブラック12が着脱自在に取付けられる。把持部37は、案内板38に摺動自在に嵌合し、案内板38に平行に延設しているボールねじ39(図2参照)に螺合している。案内板38の下部に取付けている駆動モーター40を駆動すると、把持部37は案内板38を上下動する。第3移送装置Cは第2チューブラック12を水平方向に移送するもので、案内板38は、スライダ板41に摺動自在に嵌合している。スライダ板41の端部に配設した駆動モーター42を駆動すると、図示されていないベルトの伝達力により、案内板38がスライダ板41に沿って、水平方向に移動する。

【0016】図6に示すように、第1チューブラック11と第2チューブラック12の外観形状は、上述の把持部32、37に取付けられる取手11a、12aの位置を除き同一形状である。したがって、それらの底部に形成されている孔a、bの数や配置箇所も同一であり、これらを重ね合わせたときには、孔a、bの位置は上下方向に一致する。図7及び図8に示すように、各チューブラック11、12には、底部にゴム枠11b、12bが取付けられている。また、各チューブラック11、12には通路11c、12cが設けられている。この通路11c、12cはゴム枠11b、12b及びチューブラック11、12の底部から内側壁を貫通している。

【0017】図3に示すように、第1チューブラック11の下方には、廃液バット44を配設している。図7に示すように、廃液バット44の底部にはワゴン3の廃水トラップ46を介して電磁弁50aに接続される吸入口44aを配設している。また、廃液バット44の側部には、電磁弁50b、50cとそれぞれ接続される吸入

5

口 4 4 b , 4 4 c を配設している。これら電磁弁 5 0 a ~ 5 0 c はワゴン 3 に配設される真空ポンプ 4 5 に接続される。

【0018】図 7 に示すように、DNA 抽出装置 1 は廃液バット 4 4 に隣接して、回収バット 4 7 を配設している。回収バット 4 7 には、第 2 チューブラック 1 2 の孔 b と同一位置に孔 c を設けた回収ラック 4 8 を配設し、孔 c には回収チューブ 4 9 が収納され、孔 c の側部に設けた孔 d には回収チューブ 4 7 の蓋が収納されている。この回収チューブ 4 9 の配置箇所は、チューブラック 1 2 におけるフィルターチューブ 5 4 の配置箇所、すなわち孔 b に対応して配置され、孔 c の形状は、ほぼ回収チューブ 4 9 と同形状である。回収バット 4 7 の底部には、電磁弁 5 0 d に接続される吸入口 4 7 a が配設されている。電磁弁 5 0 d は真空ポンプ 4 5 に接続される。また、回収バット 4 7 の底部にはシーケンサー 6 0 ( 図 1 2 参照 ) に電氣的に接続されている磁気センサー 4 7 b を取付け、回収ラック 4 8 の底部にはマグネット 4 8 a を取付けている。これらの配置箇所は回収ラック 4 8 が所定の場所に配置されたときに対応するように、1 つまたは複数箇所に配置する。なお、図 7 におけるチューブラック 1 1 , 1 2 及び回収バット 4 7 内に配設されるフィルターチューブ 5 1 , 5 4 及び回収チューブ 4 9 は、多数配設されているが、図においては、簡略して各チューブ 4 9 , 5 1 , 5 4 を 1 つのみ示している。

【0019】図 6 に示すように、第 1 チューブラック 1 1 の底部には、上述したように多数の孔 a が穿設され、図 8 に示すようにこの孔に第 1 フィルターチューブ 5 1 が挿通される。フィルターチューブ 5 1 は、図 9 に示すようにトップ 5 1 a とボトム 5 1 b とから成り、ボトム 5 1 b の下部がチューブラック 1 1 の孔 a を貫通して挿通される。フィルターチューブ 5 1 は、通常、円柱状とし、大きさとしては、φ 1 0 ~ 2 0 mm , 長さ 3 0 ~ 5 0 mm のものを使用することが望ましい。

【0020】第 1 フィルターチューブ 5 1 のフランジ部 5 1 c には、フィルター 5 2 が設けられ、図 1 0 にフィルター 5 2 の断面図を示す。トラップフィルター 5 2 a は、主として形質転換体である大腸菌等の菌体を捕集し、溶菌するための層である。材質としては、ガラス繊維フィルターやポリエチレン樹脂フィルターや不織布フィルター等が好ましく、大腸菌等の菌体を立体的に捕集する特性を備えていることが好ましい。

【0021】メンブランフィルター 5 2 b は、主として凝固タンパク、染色体 DNA 等の不要物の濾過・除去のための層である。材質としては、酢酸セルロース、ポリフッ化ビニリデン等が好ましく、生物学的不活性、低タンパク吸着性の特性を備えていることが好ましい。なお、チューブラック 1 1 の孔 a にフィルターチューブ 5 1 が配設されていない箇所には、黒色のめくら栓で気密に塞がれる。

6

【0022】図 1 1 は、第 2 チューブラック 1 2 の孔に支持されている第 2 フィルターチューブ 5 4 に配設しているフィルター 5 5 を示す。第 2 フィルターチューブ 5 4 は、第 1 フィルターチューブ 5 1 と同一形状であり、フィルター 5 5 のみ異なる。ガラス繊維フィルター 5 5 a , 5 5 b は、主としてプラスミド吸着補助のための層である。材質としては、微細ホウケイ酸塩ガラス繊維等が好ましく、生化学的液体に対して不活性の特性を備えていることが好ましい。

10 【0023】ガラスパウダー層 5 5 c は、主として DNA 吸着のための層である。材質としては、シリカマトリックス等が好ましく、水中沈降速度 0 . 2 5 cm / min 以下の特性を備えていることが好ましい。なお、メンブランフィルター 5 5 d の機能、材質は第 1 フィルターチューブ 5 1 のものと同じである。なお、チューブラック 1 2 の孔 b にフィルターチューブ 5 2 が配設されていない箇所には、黒色のめくら栓で気密に塞がれる。

20 【0024】図 8 に示すリザーバ 1 3 の区画 1 3 a ~ 1 3 f は DNA を抽出精製する試薬や洗浄液を注入しておくためのものである。その詳細については後述する。

【0025】図 1 2 は DNA 抽出精製装置のシステム図である。制御部であるシーケンサー 6 0 が操作パネル 4、分注ユニット 1 0 及びチューブラック 1 1 , 1 2 等の真空搬送部 D と電氣的に接続されている。また、真空搬送部 D は、ワゴン 3 の配設した排水トラップ 6 1 に配管により接続される。さらに、真空搬送部 D と真空ポンプ 4 5 はケミカルトラップ 6 2 を介在して配管により接続される。

30 【0026】以上、本発明の実施例による DNA の抽出精製方法および装置の構成について説明したが、次にその作用について説明する。

【0027】図 1 における DNA 抽出精製装置 1 を作動させる前に、ドア 5 を開き第 1 フィルターチューブ 5 1、第 2 フィルターチューブ 5 4、回収チューブ 4 9、試薬及びピペットチップ 2 8 を所定の場所にセットする。なお、試料としては、予め形質転換体培養液を図 8 に示すフィルターチューブ 5 1 に集菌する。これは、宿主微生物を大腸菌 [ E . C o l i H B 1 0 1 ( ATCC 33 694 ) とし、これを Hanahan の方法 ( Hanahan, D , 1983, J. Mol. Biol. , 166 , 577 ) に従い形質転換した形質転換体を使用する。

40 【0028】初めに、DNA 抽出精製装置 1 の電源スイッチ 8 を入れる。このとき、ドア 5 が正しく閉じられていれば、図示されていないドア開閉の検出スイッチが検知して、例えばインターロックソレノイドなどによりドア 5 をロックする。そして、分注ユニット 1 0、第 1 チューブラック 1 1 および第 2 チューブラック 1 2 を、図 8 に示す初期状態の位置に配置する。このときのチューブラック 1 1 , 1 2 の配置を模式的に図 1 3 の A に示す。図に示すようにチューブラック 1 1 , 1 2 は、上述

7

した移送装置A、Bを駆動することによりレベル0～3（なお、レベルは下の目盛りから順に0、1、2、3とする）の4段階の上下動をし、初期状態ではレベル2の高さに配置される。DNA抽出精製装置1は、初期位置移動終了後ドア5のロックを解除する。

【0029】DNA抽出精製装置1のドア5を開け、図8に示すようにフィルターチューブ51、54、回収チューブ49及びピペットチップ28を所定の場所に配置する。また、リザーバ13の区画13a～13fに所定の試薬を注入した後、ドア5を閉じて操作パネル4に配

設しているスタートキーを押す。  
【0030】DNA抽出精製装置1は、スタートキーを押すとセット状態の確認動作を行う。すなわち、チューブ有無確認動作では、各チューブラック11、12を図13のBに示すように、レベル3の位置に配置する。そして、図8に示す分注ユニット10を水平方向に左右に往復運動させ、分注ユニット10に配設しているチューブ有無確認センサー29で、各フィルターチューブ51、54の有無を確認する。

【0031】チェック内容は、図6のチューブラック11、12の×印にフィルターチューブ51、54が挿入されているような場合は、チューブラック11と12におけるフィルターチューブ51、54のセットパターンが同一か、このセットパターンが装置の規則に適合しているかを確認する。この場合、チューブラック11、12の×印以外の孔a、bは、黒色のめくら栓で塞がれているので、フィルターチューブ51、54とめくら栓との、色の反射率の相違をチューブ有無確認センサー29が検出して、フィルターチューブ51、54のセットパターンを判断する。セットパターンが不可のときはエラーとなり、ポーズ状態となる。セットパターンが良のときは、試薬液量確認動作へ移る。

【0032】試薬液量確認動作では、高さ調整用モーター20を駆動し、サブブラケット10bを下げ、ピペットチューブスタンド14の第1列のピペットチップ28aを装着する。次いで、分注ユニット10を移送しピペットチップ28aをリザーバ13の第1列目の区画13aの試薬に挿入し、液面センサー30で試薬の液量を判定する。再び、分注ユニット10をピペットチューブスタンド14上まで移送し、ピペットチップ28aを外してもとの位置に戻す。そして、同様に第2列のピペットチップ28bで区画13bの試薬の液量を測り、順次、第3列～第6列まで測り、フィルターチューブ51、54の本数に対して、各試薬の量が不足していないかチェックする。なお、ピペットチップ28a～28fは区画13a～13fに対応させて使用する。試薬の量が規定以上のとき、セットパターンが良のときは、溶菌及び不要蛋白質や染色体DNAの変性を行い、必要に応じて不要RNAの分解を行う工程に入る。

【0033】溶菌及び不要蛋白質や染色体DNAの変性

8

を行い、必要に応じて不要RNAの分解を行う工程では、図13のCに示すように、チューブラック11をレベル0の位置、すなわち廃液バット44上に当接して配置される。チューブラック11の底部にはゴム11bを取付けているので、それらの当接部は気密が保たれる。そして、真空ポンプ45を2分作動しバルブ44aから空気を吸引し、フィルターチューブ51から大腸菌以外の液を濾過する。

【0034】チューブラック11、12を図13のCに示す位置から図14のAに示す位置に移送する。すなわち、DNA抽出精製装置1は、自動制御によりチューブラック11をレベル3の試薬の添加位置まで上昇させ、チューブラック12をレベル1まで下降して、更に左方に移送する。ここで、分注ユニット10は区画13aからピペットチップ28aが溶菌用試薬を吸引し、この200～400μlの溶菌用試薬をフィルターチューブ51のトラップフィルター52aに添加し、室温にて10分間放置する。この工程では、形質転換体を溶菌させ、核外遺伝子（プラスミドDNA）を細胞外に溶出する。また、この工程で、同時に溶菌用試薬によって不要なRNAを消化する。溶菌酵素としては、リゾチーム(lysozyme)を含み、RNA分解酵素として、リボヌクレアーゼAを含むものを使用する。

【0035】次いで、第1のフィルターチューブ51による不純物濾過工程を行う。この工程では、分注ユニット10を移動してピペットチップ28bで、区画13bの試料の完全可溶化処理のための試薬を吸引し、フィルターチューブ51のトラップフィルター52aに添加する。そして、室温にて5分間放置することにより、試料の完全可溶化処理を行った。試料の完全可溶化処理のための試薬としては、0.2N水酸化ナトリウム・1%ラウリル硫酸ナトリウム溶液を400μl添加している。

【0036】次いで、分注ユニット10を移動してピペットチップ28cで区画13cの3M酢酸カリウム(pH4.8)を吸引し、フィルターチューブ51のトラップフィルター52aに300μl添加する。そして、室温にて5分間放置し、塩基性溶液を中和するとともに、細胞構成タンパク質及び染色体DNAを凝固処理する。

【0037】この後、第2のDNA抽出精製用カートリッジでDNAを吸着、洗浄、溶出する工程を行う。この工程では、分注ユニット10を移動してピペットチップ28dで区画13dのDNA吸着のための試薬として8Mヨウ化ナトリウムNaIまたは10Mチオシアン酸ナトリウム(NaSCN)を吸引し、フィルターチューブ51に添加する。ここで、チューブラック11、12を図14のBの位置に移送する。すなわち、チューブラック12をレベル0の位置に下降させ、同じくチューブラック11をレベル2の位置に下降させる。

【0038】この状態では、図7に示すようにチューブラック11とチューブラック12とが重なり減圧室Eを

形成し、チューブラック 12 と廃液バット 44 が重なり減圧室 F を形成する。チューブラック 11 の底部にはゴム棒 11b が設けられ、これとチューブラック 12 との当接面は気密が保たれる。また、チューブラック 12 の底部にゴム 12b を取付けているので、これと廃液バット 44 との当接面は気密が保たれる。

【0039】そして、真空ポンプ 45 を 10 分間作動し吸入口 44a, 44c から空気を吸引する。チューブラック 11 のチューブフィルタ 51 は、チューブラック 12 の側部に設けられている通気孔 12b を介して、吸入口 44c により吸引される。こうして、第 1 フィルターチューブ 51 から第 2 フィルターチューブ 54 へプラスミド抽出液を回収する。

【0040】このときプラスミド DNA が第 2 フィルターチューブ 54 のガラスパウダー層 55c に吸着する。なお、この工程で、第 1 フィルターチューブ 51 の試料を第 2 フィルターチューブ 54 に真空吸引して移し換える場合に、空間 F のみ減圧すればよい。しかしながら、真空引きの初めや真空解除時に減圧室 E と F に圧力差があると、移し換えた第 2 フィルターチューブ 54 にある試料が廃液バット 44 に漏れ出てしまうようなことがある。そこで、チューブラック 11 に通路 12c を設け、減圧室 E, F を同圧力に減圧するようにしている。

【0041】次いで、図 14 の C に示すように、チューブラック 11 のみをレベル 3 まで上昇させ、吸入口 44a に接続している電磁弁 50a を開きチューブラック 12 のフィルターチューブ 54 を、真空ポンプで 2 分間吸引する。これにより、フィルターチューブ 54 のヨウ化ナトリウムを吸引濾過する。

【0042】洗浄工程では、図 15 の A に示すように、チューブラック 11 とチューブラック 12 の配置を図 13 の C の状態と上下を逆にする。すなわち、チューブラック 12 を右方に移送し、チューブラック 11 をレベル 0 まで下降させ、さらにチューブラック 12 をレベル 3 まで上昇させて左方に移送する。そして、分注ユニット 10 のピペットチップ 28e により、フィルターチューブ 54 に洗浄用緩衝液として 10 mM トリス- 塩酸 (pH 8.0)・1 mM EDTA・0.2 M NaCl・50% エタノールを 1000  $\mu$ l 添加する。

【0043】次いで、図 15 の B に示すように、チューブラック 11 をレベル 0 に下降させ、チューブラック 12 をレベル 2 に下降させる。電磁弁 50a, 50b を開き、真空ポンプで 15 分間吸入口 44a, 44b から吸引し、洗浄液をフィルターチューブ 54 からフィルターチューブ 51 へ排出する。なお、このときチューブラック 11 と 12 とが、図 7 に示す状態と上下逆になっていることから、チューブラック 11 の通路 11c と吸入口 44b とが連通することにより、フィルターチューブ 54 の洗浄液は真空吸引される。この後、2 回目の洗浄工程を行う。内容は上記段落 0042 と同様で、洗浄用緩

衝液の容量は 500 ml である。次に、図 15 の C に示すように、チューブラック 12 をレベル 3 まで上昇し、右方に移送する。そして、分注ユニット 10 のピペットチップ 28f により、フィルターチューブ 54 に、溶出用緩衝液として蒸留水 / 10 mM トリス- 塩酸 (pH 8.0)・1 mM EDTA を 50 ~ 200  $\mu$ l 添加する。

【0044】フィルターチューブ 11 の廃液を排出するため電磁弁 50a を開き、真空ポンプ 45 により吸引排出する。そして、図 16 に示すように、チューブラック 12 をレベル 0 まで下降させ電磁弁 50a を開き、DNA をフィルターチューブ 54 から回収バット 47 に配設した回収チューブ 49 にプラスミド DNA を回収する。なお、回収ラック 48 が配設されていないとき、または所定の位置からずれて配置されているようなときは、スタート時に警報されるが、回収ラック 48 に回収チューブ 49 を入れ忘れたときには、そのまま操作が行われる。しかし、回収ラック 48 の孔 c は回収チューブ 49 の孔 c に回収できるので、後でプラスミド DNA を移し換えればよい。

【0045】以上、説明したように、本実施の形態によれば、短時間 (約 2 時間) で遺伝子組換え技術に必要なプラスミド DNA を全自動で抽出精製することができる。また、DNA の抽出精製をフィルターを使用した真空吸引により行っているため、コストが安く純度の高いプラスミド DNA を提供することができる。

【0046】以上、本発明の実施例について説明したが、勿論、本発明はこれに限定されることなく本発明の技術的思想に基いて種々の変形が可能である。

【0047】例えば以上の実施例では、第 1 チューブラック 11 を垂直方向のみ移送できるようにし、第 2 チューブラック 12 を水平方向及び垂直方向に移送できるようにしたが、これを反対にしてもよいし、両者とも両方向に移送可能にしてもよい。

【0048】

【発明の効果】以上より明らかのように、本発明によれば、遠心分離器を使用することなく、形質転換体で複製増幅された核外遺伝子 DNA (プラスミド DNA) を、終夜培養液から短時間で大量の試料を抽出精製することができる。また、DNA の抽出精製をフィルターを使用した真空吸引により行っているため、コストが安く純度の高いプラスミド DNA を提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図 1】本発明の実施の形態による DNA 抽出精製装置の全体斜視図である。

【図 2】同 DNA 抽出精製装置の本体の側面図である。

【図 3】同 DNA 抽出精製装置の本体の図 2 における X-X 線方向の縦断面図である。

【図 4】同 DNA 抽出精製装置の本体の平面図である。

【図 5】同 DNA 抽出精製装置の分注ユニットの拡大側

面図である。

【図6】同DNA抽出精製装置の本体の下部の平面図である。

【図7】同DNA抽出精製装置の真空搬送部の概略断面図である。

【図8】同DNA抽出精製装置の本体の下部の概略断面図である。

【図9】図9のAは、フィルターチューブの上方と下方から見た平面図である。図9のBは、フィルターチューブの部分破断断面図である。

【図10】第1フィルターチューブに配設したフィルター等の拡大断面図である。

【図11】第2フィルターチューブに配設したフィルター等の拡大断面図である。

【図12】本発明のDNA抽出精製装置のシステム図である。

【図13】図12のA～Cは第1チューブラックと第2チューブラックの配置を示す概略図である。

【図14】図13のA～Cは第1チューブラックと第2チューブラックの配置を示す概略図である。

【図15】図14のA～Cは第1チューブラックと第2チューブラックの配置を示す概略図である。

【図16】第1チューブラックと第2チューブラックの配置を示す概略図である。

【符号の説明】

1 DNA抽出精製装置

\* 2 本体

10 分注ユニット

11 第1チューブラック

11c 通路

12 第2チューブラック

12c 通路

13 リザーバ

14 ビベットチューブスタンド

29 チューブ有無確認センサー

10 44 廃液バット

45 真空ポンプ

47 回収バット

47b 磁気センサー

48 回収ラック

48a マグネット

50a～50d 電磁弁

51 第1フィルターチューブ

52 フィルター

52b, 55d メンブランフィルター

20 54 第2フィルターチューブ

55 フィルター

55a, 55b ガラス繊維フィルター

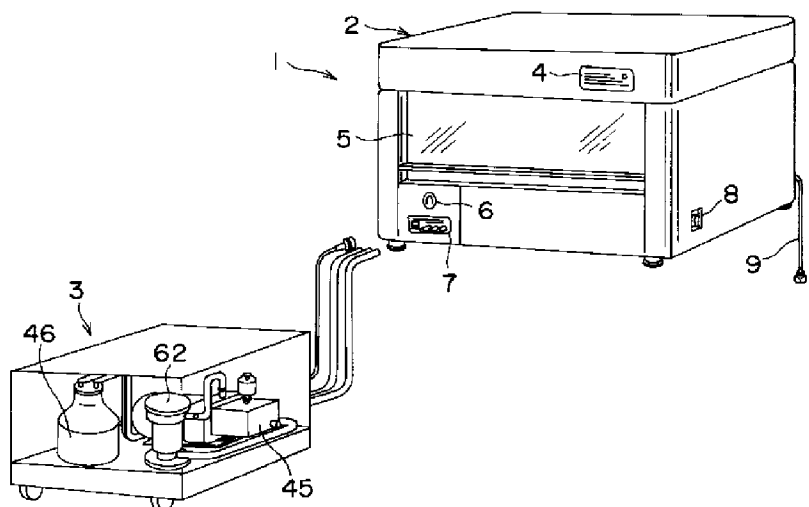
55c ガラスパウダー層

A 第1移送装置

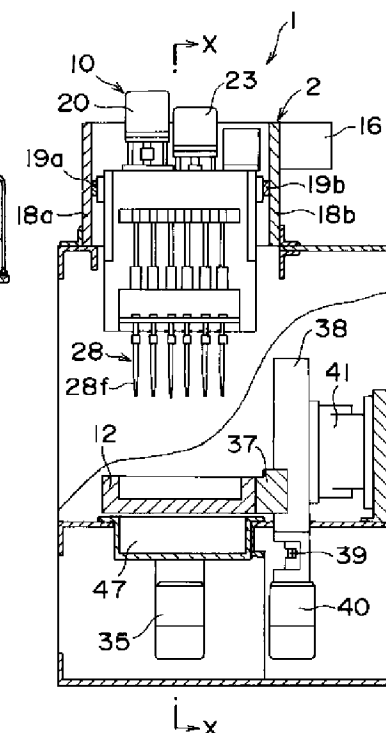
B 第2移送装置

\* C 第3移送装置

【図1】

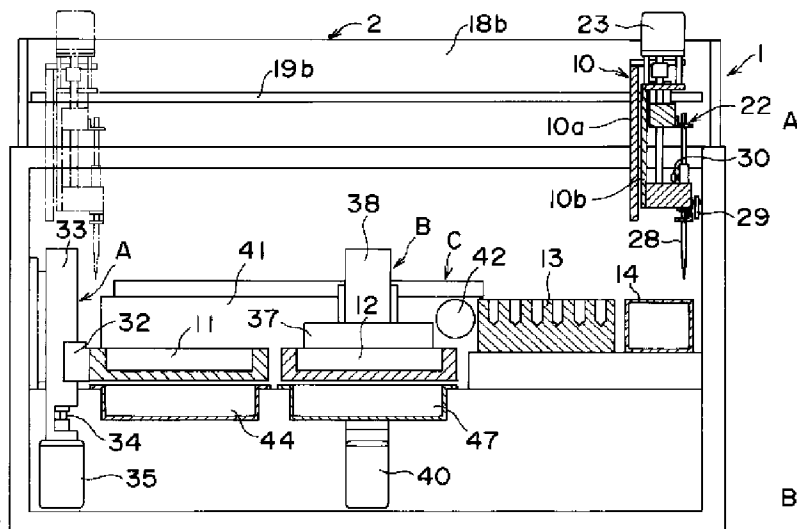


【図2】

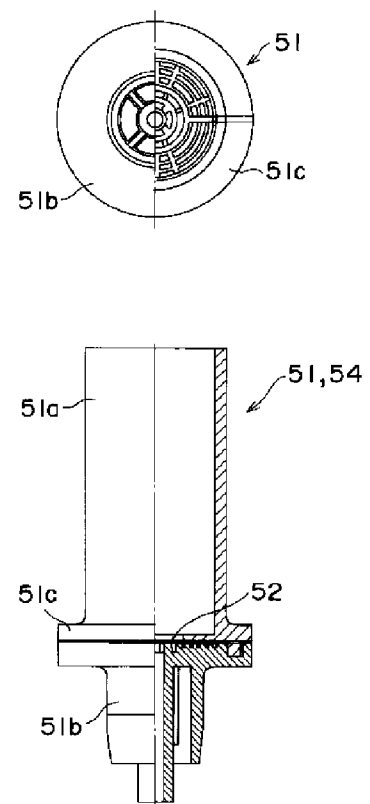




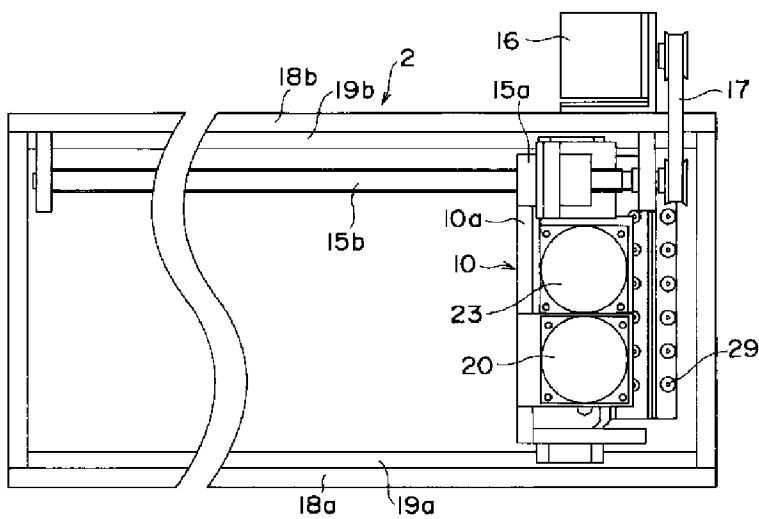
【図 3】



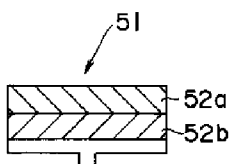
【図 9】



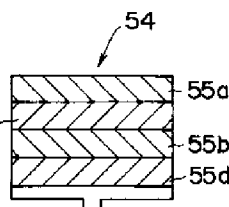
【図 4】



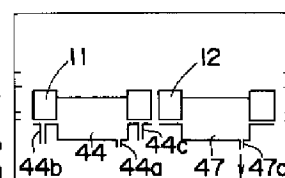
【図 10】



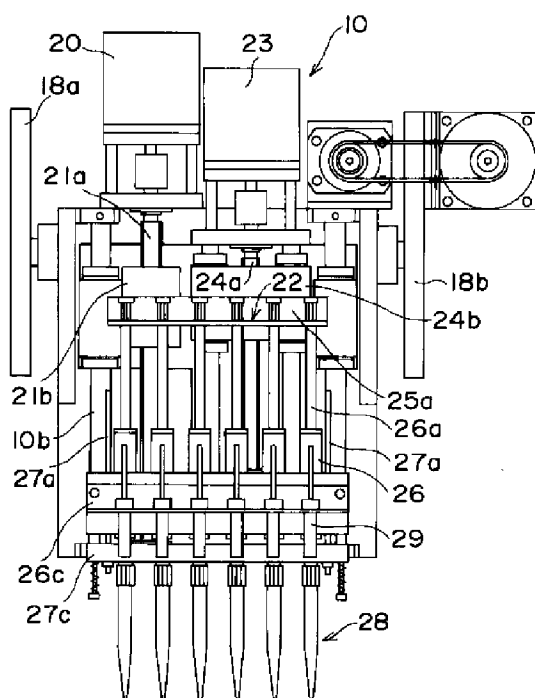
【図 11】



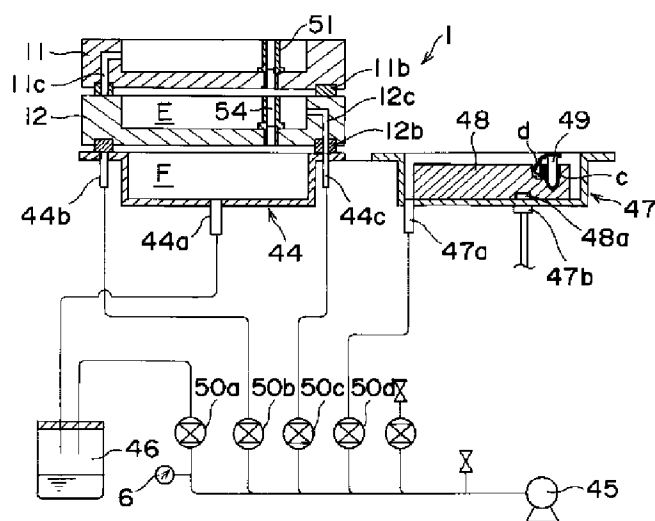
【図 16】



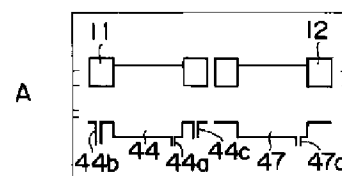
【図5】



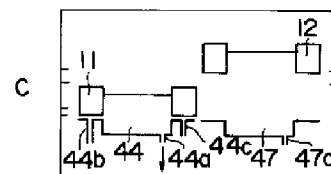
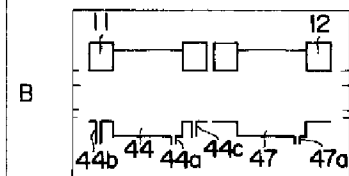
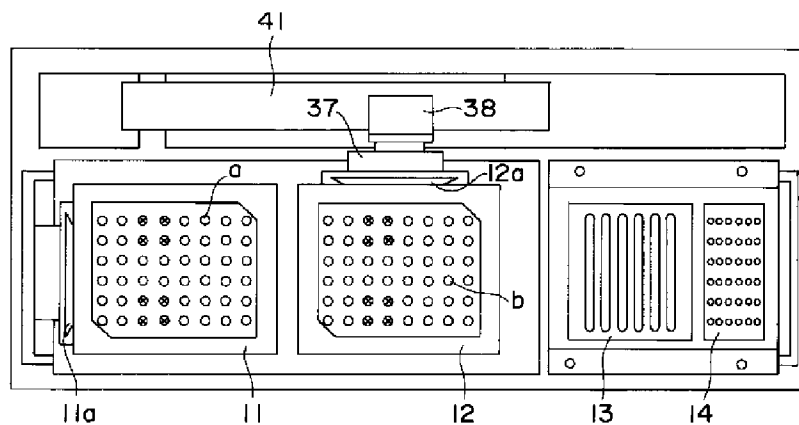
【図7】



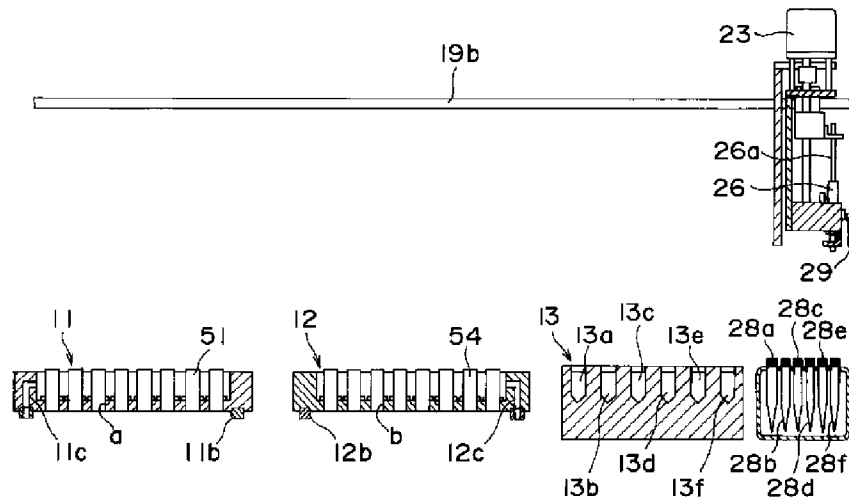
【図13】



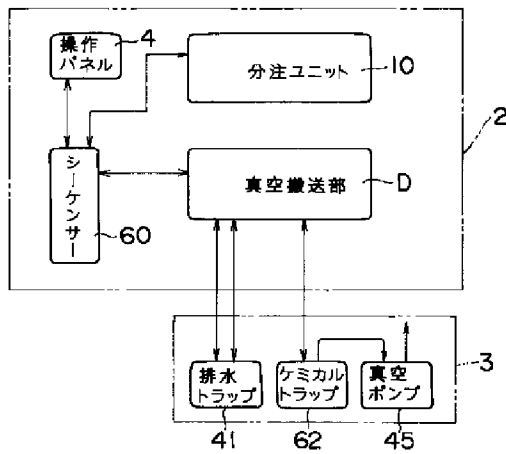
【図6】



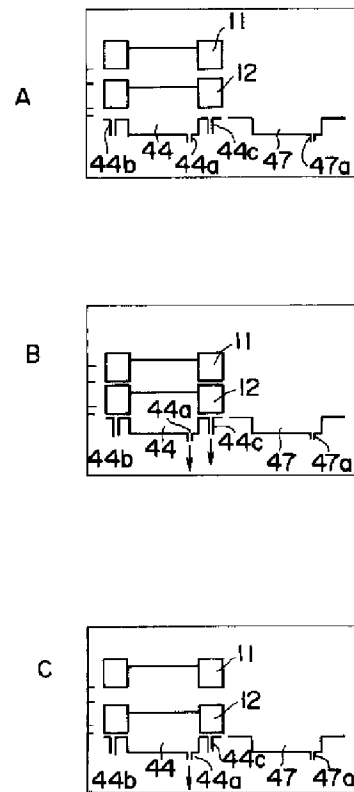
【図 8】



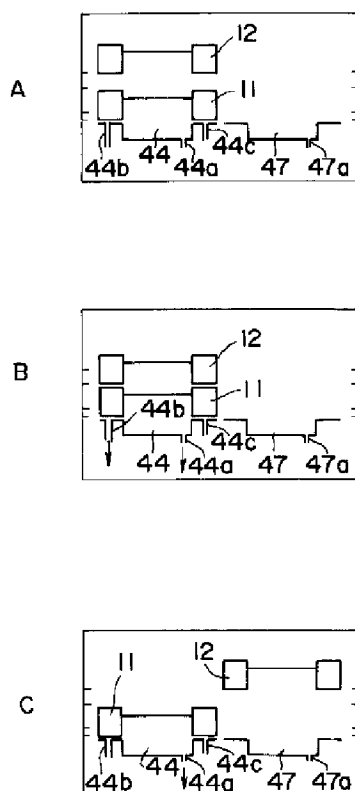
【図 12】



【図 14】



【図 15】



## 【手続補正書】

【提出日】平成 7 年 9 月 2 9 日

## 【手続補正 1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0010

【補正方法】変更

## 【補正内容】

【0010】図 2 及び図 3 は本体 2 の内部構造を示す。本体 2 は、分注ユニット 10、第 1 チューブラック 11、第 2 チューブラック 12、リザーバ 13 及びチップスタンド 14 から成る。分注ユニット 10 は、本体 2 の内部を横方向に移動することができる。この機構を説明すると図 4 の平面図に示すように、分注ユニット 10 はメインブラケット 10a にボールナット 15a を取付け、これをボールねじ 15b に螺合させている。モーター 16 を駆動すると、ベルト 17 の回転によりボールねじ 15b が回転し、分注ユニット 10 は案内板 18a、18b に取付けているレール 19a、19b に沿って横方向に移動する。

## 【手続補正 2】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】0032

【補正方法】変更

## 【補正内容】

【0032】試薬液量確認動作では、高さ調整用モーター 20 を駆動し、サブブラケット 10b を下げ、チップスタンド 14 の第 1 列のピペットチップ 28a を装着する。次いで、分注ユニット 10 を移送しピペットチップ 28a をリザーバ 13 の第 1 列目の区画 13a の試薬に挿入し、液面センサー 30 で試薬の液量を判定する。再び、分注ユニット 10 をチップスタンド 14 上まで移送し、ピペットチップ 28a を外してもとの位置に戻す。そして、同様に第 2 列のピペットチップ 28b で区画 13b の試薬の液量を測り、順次、第 3 列～第 6 列まで測り、フィルターチューブ 51、54 の本数に対して、各試薬の量が不足していないかチェックする。なお、ピペットチップ 28a～28f は区画 13a～13f に対応させて使用する。試薬の量が規定以上のとき、セットパターンが良のときは、溶菌及び不要蛋白質や染色体 DNA の変性を行い、必要に応じて不要 RNA の分解を行う工程に入る。

## 【手続補正 3】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】符号の説明

【補正方法】変更

## 【補正内容】

## 【符号の説明】

- |       |              |               |               |
|-------|--------------|---------------|---------------|
| 1     | DNA抽出精製装置    | * 4 7 b       | 磁気センサー        |
| 2     | 本体           | 4 8           | 回収ラック         |
| 1 0   | 分注ユニット       | 4 8 a         | マグネット         |
| 1 1   | 第 1 チューブラック  | 5 0 a ~ 5 0 d | 電磁弁           |
| 1 1 c | 通路           | 5 1           | 第 1 フィルターチューブ |
| 1 2   | 第 2 チューブラック  | 5 2           | フィルター         |
| 1 2 c | 通路           | 5 2 b , 5 5 d | メンブランフィルター    |
| 1 3   | リザーバ         | 5 4           | 第 2 フィルターチューブ |
| 1 4   | チップスタンド      | 5 5           | フィルター         |
| 2 9   | チューブ有無確認センサー | 5 5 a , 5 5 b | ガラス繊維フィルター    |
| 4 4   | 廃液バット        | 5 5 c         | ガラスパウダー層      |
| 4 5   | 真空ポンプ        | A             | 第 1 移送装置      |
| 4 7   | 回収バット        | B             | 第 2 移送装置      |
|       |              | C             | 第 3 移送装置      |
|       |              | *             |               |

-----  
フロントページの続き

( 72 ) 発明者 石井 隆麿  
東京都練馬区旭町 2 丁目 2 番 12 号 株式会  
社トミー精工内